

H9-301866A

<Partial English Translation>

Lines 22 and 23, Column 5 of Page 4:

As the dissolving agents, N-methyglucamine and the like can be employed.

Pages 5-6:

[0020] Pharmacological Test 1

(1) Test Liquids

Using 2-(4-chlorobenzoyl-amino)-3-(2-quinolon-4-yl)-propionic acid (hereinafter referred to merely as "the compound of the present invention") which is the specific example of the active ingredient of the present invention, a solution and a suspension were prepared by the below-described formulation to make them the test liquids.

a) 3% Solution:

The compound of the present invention	3.00 g
Meglumine (N-Methylglucamine)	2.64 g
Concentrated glycerin	1.80 g
Hydrochloric acid	q.s.
10% Benzalkonium	0.10 ml
Water	<u>Added to make the whole volume up to 100 ml</u>
pH	Adjusted to a value in the range of 8.3 to 9.3

BEST AVAILABLE COPY

b) 3% Suspension:

The compound of the present invention	3.00 g
Sodium dihydrogenphosphate	0.40 g
Disodium hydrogenphosphate	0.47 g
Sodium chloride	0.50 g
Sodium carboxymethylcellulose	0.20 g
Polysorbate 80	0.16 g
10% Benzalkonium chloride	0.10 ml

Water Added to make the whole volume up to 100 ml

pH Adjusted to a pH in the range of 6.5 to 7.5

Physiological saline was used as a control test in place of the test liquids.

Pages 6-7:

[0025] Pharmacological Test 2

(1) Experimental Method

The eyeballs were enucleated from a female household rabbit of the New Zealand White species to prepare a test piece of the sclerocornea. After peeling off the Descemet's membrane and the endotheliocyte under light microscope, then the test piece of the sclerocornea was washed 4 to 5 times with a phosphate buffered physiological saline to make the test piece sterile. Then, said the test piece of the sclerocornea was placed on Dulbecco's modified Eagle's culture medium F12 (DME/F12) (1:1) to thereby cut about 20 cornea blocks of the dimension of 2 to 3 mm square out of one whole cornea with use of a razor blade. In a tissue culture dish with a diameter of 60 mm, 7 to 8 cornea blocks

per dish were arranged to adhere to one another, with the cornea epithelia upward, and were cultivated in DME/F12 (1:1) culture medium supplemented with 10% FCS and 10 ng/ml of hEGF under the atmosphere consisting of 5% of CO₂ and 95% of air at 37 °C. After cultivation for 2 days, the corneal epithelium species were removed and the culture medium was exchanged. The cultivation was continued for 4 to 5 days (the culture medium was exchanged once to three times), and after removal of the culture medium and washing with a phosphate buffer, the cells were floated through treatment with 0.1 % trypsin-0.02% EDTA, and suspended in DMF/F12 (1:1) medium admixed with 10% FCS, followed by sowing into 12-well multiwell culture dish at a rate of 2 × 10⁴ cells/well. About 12 hours later, the culture medium was exchanged with DME/F12 (1:1) medium admixed with 1 % of FCS, and the compound of the present invention was added to the final concentration of 10⁻⁴ to 10⁻⁶, as was the same with Physiological Test 1, whereby the compound was dissolved in DMSO. 48 Hours after addition of the compound of the present invention, the culture medium containing the compound of the present invention was exchanged. 96 Hours after the addition of the compound of the present invention, the cells were floated through treatment with 0.1% trypsin-0.02% EDTA, and the number of the cells was determined (mean value ±S.E., n=6) by using a Coulter counter. As a control, sodium hyaluronate (1 mg/ml) was used in place of the compound of the present invention to make the similar determination.

(2) Results

The results are shown in Fig. 4. As can be seen from FIG. 4, the treatment with the compound of the present invention

was observed to produce by far improved proliferation effect, as compared with sodium hyaluronate which is known to exhibit cornea-epithelium proliferating activity. In the Fig. 4, the symbol "*" means $p < 0.05$ vs control, while the symbol "**" means $p < 0.01$.

END

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-301866

(43)公開日 平成9年(1997)11月25日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 31/47	ABL		A 6 1 K 31/47	ABL
9/08			9/08	V
9/107			9/107	U
// C 0 7 D 215/22			C 0 7 D 215/22	

審査請求 未請求 請求項の数10 O L (全 9 頁)

(21)出願番号	特願平8-269880
(22)出願日	平成8年(1996)10月11日
(31)優先権主張番号	特願平7-263896
(32)優先日	平7(1995)10月12日
(33)優先権主張国	日本(J P)
(31)優先権主張番号	特願平8-57337
(32)優先日	平8(1996)3月14日
(33)優先権主張国	日本(J P)

(71)出願人	000206956 大塚製薬株式会社 東京都千代田区神田司町2丁目9番地
(72)発明者	浦島 博樹 兵庫県赤穂市塙屋2715-3
(72)発明者	竹治 康広 兵庫県赤穂市坂越3150 アース製薬コスマドーム302号
(72)発明者	篠原 久司 岐阜県岐阜市大宮町1丁目13番地の1
(72)発明者	藤澤 茂樹 兵庫県高砂市米田町島72-5
(74)代理人	弁理士 青山 葵 (外1名)

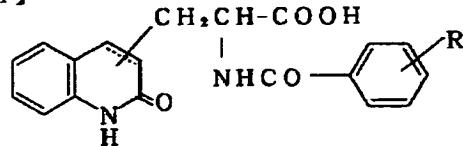
(54)【発明の名称】 眼疾患治療剤

(57)【要約】

【課題】 とくにドライアイ(眼球乾燥症候群)の治療に有用な眼疾患治療剤を提供する。

【解決手段】 一般式

【化1】



【式中、Rはハロゲン原子を意味する】で示されるカルボスチリル誘導体またはその塩を有効成分とする眼疾患治療剤。

その塩、とくに好ましくは2-(4-クロルベンゾイルアミノ)-3-(2-キノロン-4-イル)プロピオン酸またはその塩を有効成分とする眼疾患治療剤、ことにドライアイと通称される眼球乾燥症候群の治療剤に関する。

【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】上記一般式(I)で示されるカルボスチリル誘導体およびその製法は特公昭63-35623号公報に記載されており、それらが抗潰瘍剤として有用であることも知られている。ドライアイとは、涙の量が減少して、目の表面が正常状態を保てなくなった状態をいう。また、涙の量の異常ばかりでなく、涙の性質の異常によっても目の表面の粘膜(角膜および結膜の上皮)が異常を起こすことがある(ドライアイ、日本評論社、坪田一男著、11頁)。また、シェーグレン症候群でもドライアイとなり、涙液の異常が見られ、スチーブンソンソン症候群も末期にはドライアイとなり、角結膜が障害されることが知られている。

【0003】涙液は眼球の最外層を覆う厚さ約7μmの非常に薄い液層であり、油層・水層・ムチン層の3層構造を有している。一番表層にある油層は油の膜であり、主にマイボーム線と呼ばれるまぶたのまわりにある腺から産生されて水層全体を覆っている。この層は水分の蒸発を防ぐ機能を持っているといわれている。水層はいわゆる涙と呼ばれている部分で、涙液の厚さの大半を占め、その構成成分の98%は水である。この水層の減少がいわゆるドライアイである。ムチン層は疎水性である角膜上皮の表面を覆い、親水性に変え、涙液中の水層の保持、伸展を助け、水層を角膜上皮の表面に保持することができる。そのムチン層を産生している細胞がゴブレット細胞である。このように、ドライアイを引き起こす直接の原因である涙液も種々の組織細胞が関与しており、またドライアイの概念も複雑であって、通常の目薬では一時的な処置をもたらすに過ぎず、その根本的な治療法が見い出されていないのが現状である。したがって、ドライアイの新しい治療方法、新しい治療剤の開発が強く望まれている。

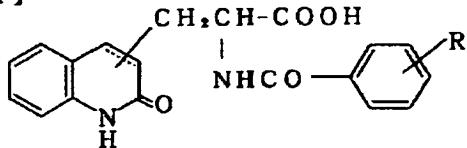
【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、種々研究を重ねるうちに、前記一般式(I)で表されるカルボスチリル誘導体、なかんずく、2-(4-クロルベンゾイルアミノ)-3-(2-キノロン-4-イル)プロピオン酸またはその塩が眼のゴブレット細胞の増加作用、眼の粘液增加作用、角膜上皮細胞の増殖促進作用、さらに涙液增加作用を有し、ドライアイ、すなわち眼球乾燥症候群の治療剤として有用であることを見い出し、本発明を完成するに至った。本発明の一般式(I)で表されるカルボスチリル誘導体、なかんずく、2-(4-クロルベンゾイルアミノ)-3-(2-キノロン-4-イル)

【特許請求の範囲】

【請求項1】一般式

【化1】



【式中、Rはハロゲン原子を意味し、該カルボスチリル骨格上の置換位置は3位または4位であり、またカルボスチリル骨格の3位と4位間の結合は1重結合または2重結合を示す】で示されるカルボスチリル誘導体またはその塩を有効成分とする眼疾患治療剤。

【請求項2】眼のゴブレット細胞増加剤である請求項1に記載的眼疾患治療剤。

【請求項3】眼の粘液量増加剤である請求項1に記載的眼疾患治療剤。

【請求項4】涙液増加剤である請求項1に記載的眼疾患治療剤。

【請求項5】眼疾患が眼球乾燥症候群(ドライアイ)である請求項1に記載的眼疾患治療剤。

【請求項6】眼の創傷治療剤である請求項1に記載的眼疾患治療剤。

【請求項7】眼の創傷が角膜上皮創傷である請求項6に記載的眼疾患治療剤。

【請求項8】有効成分が2-(4-クロルベンゾイルアミノ)-3-(2-キノロン-4-イル)プロピオン酸またはその塩である請求項1~7項のいずれかに記載的眼疾患治療剤。

【請求項9】眼に適用する製剤形態である請求項8に記載的眼疾患治療剤。

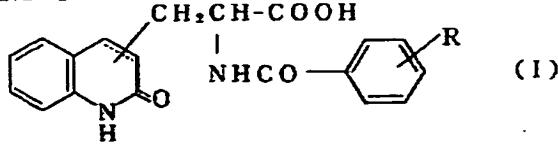
【請求項10】2-(4-クロルベンゾイルアミノ)-3-(2-キノロン-4-イル)プロピオン酸またはその塩および眼科用製剤担体を含有する眼に適用する製剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、カルボスチリル誘導体またはその塩を有効成分とする眼疾患治療剤、さらに詳しくは、下記一般式(I)

【化2】



【式中、Rはハロゲン原子を意味し、該カルボスチリル骨格上の置換位置は3位または4位であり、またカルボスチリル骨格の3位と4位間の結合は1重結合または2重結合を示す】で示されるカルボスチリル誘導体または

プロピオン酸またはその塩は眼のゴブレット細胞を増加することによってムチンの産生量を増加し、ドライアイにみられるムチンの減少を防ぐ一方、眼の粘液量を増加して水層を保持する。また、涙液量の増加作用を示し、ドライアイ治療剤として有用である。さらに、本発明の化合物はドライアイ症状を示すシェーグレン症候群やスチーブンジョンソン症候群にも有用であるばかりでなく、ドライアイに起因する2次疾患あるいはゴブレット細胞や粘液量の低下によって起こる種々の眼疾患の予防および／または治療剤として有用である。また、ドライアイは眼球が乾燥しているため非常に傷つき易いが、本発明の化合物は角膜上皮細胞の増殖作用を有するため、眼の創傷、特に角膜上皮の創傷治療剤あるいは眼手術（白内障、硝子体、縁内障）時の眼内灌流および洗浄剤等としても有用である。

【0005】

【発明の実施の形態】本発明の眼疾患治療剤は、前記一般式（I）で示されるカルボスチリル誘導体またはその塩を有効成分とし、一般的な医薬製剤の形態に調製される。そのような製剤は通常使用される充填剤、增量剤、結合剤、付湿剤、崩壊剤、表面活性剤、滑沢剤などの希釈剤あるいは賦形剤を用いて調製される。この医薬製剤としては各種の形態が治療目的に応じて選択でき、その代表的なものとして錠剤、丸剤、散剤、液剤、懸濁剤、乳剤、顆粒剤、カプセル剤、坐剤、注射剤（液剤、懸濁剤等）、エアゾール剤、シロップ剤などが挙げられる。また、樹脂などに配合して徐放性を高めて使用することもできる。本発明の眼疾患治療剤は、その適応症からも、眼適用製剤、例えば点眼剤、眼軟膏剤等の形に調製するのが特に好ましい。

【0006】錠剤の形態に成形するに際しては、担体としてこの分野で従来公知のものを広く使用でき、例えば乳糖、白糖、塩化ナトリウム、ブドウ糖、尿素、デンプン、炭酸カルシウム、カオリン、結晶セルロース、ケイ酸などの賦形剤、水、エタノール、プロパノール、単シロップ、ブドウ糖液、デンプン液、ゼラチン溶液、カルボキシメチルセルロース、セラック、メチルセルロース、リン酸カリウム、ポリビニルピロリドンなどの結合剤、乾燥デンプン、アルギン酸ナトリウム、カンテン末、ラミナラン末、炭酸水素ナトリウム、炭酸カルシウム、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸モノグリセリド、デンプン、乳糖などの崩壊剤、白糖、ステアリン、カカオバター、水素添加油などの崩壊抑制剤、第四級アンモニウム塩基、ラウリル硫酸ナトリウムなどの吸収促進剤、グリセリン、デンプンなどの保湿剤、デンプン、乳糖、カオリン、ペントナイト、コロイド状ケイ酸などの吸着剤、精製タルク、ステアリン酸塩、ホウ酸末、ポリエチレングリコールなどの滑沢剤などが例示できる。さらに錠剤は必要に応じ通常の剤皮を施した錠剤、例え

ば糖衣錠、ゼラチン被包錠、腸溶被錠、フィルムコーティング錠あるいは二重錠、多層錠とすることができる。

【0007】丸剤の形態に成形するに際しては、担体としてこの分野で従来公知のものを広く使用でき、例えば、ブドウ糖、乳糖、デンプン、カカオ脂、硬化植物油、カオリン、タルクなどの賦形剤、アラビアゴム末、トラガント末、ゼラチン、エタノールなどの結合剤、ラミナラン、カンテンなどの崩壊剤などが例示できる。坐剤の形態に成形するに際しては、担体として従来公知のものを広く使用でき、例えばポリエチレングリコール、カカオ脂、高級アルコール、高級アルコールのエステル類、ゼラチン、半合成グリセライドなどを挙げることができる。

【0008】注射剤として調製される場合には、液剤、乳剤または懸濁剤として調製され、それらは、通常、殺菌され、かつ血液と等張であるのが好ましい。これら液剤、乳剤および懸濁剤の形態に成形するに際しては、希釈剤としてこの分野において慣用されているのをすべて使用でき、例えば水、エチルアルコール、プロピレングリコール、エトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類などを挙げができる。なお、この場合等張性の溶液を調製するに充分な量の食塩、ブドウ糖あるいはグリセリンを該治療剤中に含有せしめてもよく、また通常の溶解補助剤、緩衝剤、無痛化剤などを、更に必要に応じて着色剤、保存剤、香料、風味剤、甘味剤などや他の医薬品を該治療剤中に含有せしめてもよい。

【0009】エアゾール剤は、通常、殺菌された液剤または懸濁剤とし、これに噴射剤を配合して調製される。これら液剤および懸濁剤の形態に成形するに際しては、希釈剤としてこの分野において慣用されているのすべて使用でき、例えば上記注射剤で挙げたものを例示できる。噴射剤としては、この分野において慣用されているものすべて使用でき、例えば、フロン12等の塩化フッ化炭素、フロン123等の液化ガス噴射剤、さらに窒素、炭酸ガス等の圧縮ガス噴射剤が挙げられる。またこのエアゾール剤には、通常の溶解補助剤、緩衝剤など、更に必要に応じて、着色剤、保存剤、香料、風味剤、甘味剤などを含有せしめてもよい。

【0010】点眼剤、眼軟膏剤等の眼適用製剤は通常の眼科用製剤担体を用い常法にしたがって製造される。すなわち、該有効成分を適当な基剤と混合し、滅菌処理することにより製造される。例えば、眼軟膏剤を製造するには、慣用の乳剤性基剤、水溶性基剤、懸濁性基剤等を使用できる。これら基剤の代表例としては、例えば白色ワセリン、精製ラノリン、流動パラフィン等を例示できる。また、点眼剤を製造するには、基剤として代表的には滅菌蒸留水を使用できる。さらに、眼適用製剤には必要に応じて溶解補助剤、緩衝剤、抗酸化剤、防腐剤、等

張化剤、pH調整剤等を配合することができる。溶解補助剤としては例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリオキシエチレンラウリルエーテル、ポリオキシエチレンオレイルエーテル等のポリオキシエチレングリコールエーテル類、ポリエチレングリコールモノラウレート、ポリエチレングリコールモノオレート等のポリエチレングリコール高級脂肪酸エステル類、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル等が挙げられる。緩衝剤としては、例えばリン酸ナトリウム、リン酸水素ナトリウム、リン酸水素カリウム、硼酸、硼酸ナトリウム、クエン酸、クエン酸ナトリウム、酒石酸、酒石酸ナトリウム、酢酸、酢酸ナトリウム、イプシロンアミノカプロン酸、グルタミン酸ナトリウム等が挙げられる。抗酸化剤としては、例えば亜硫酸ナトリウム、ピロ亜硫酸ナトリウム、重亜硫酸ナトリウム、チオ亜硫酸ナトリウム、アスコルビン酸等が挙げられる。防腐剤としては、例えばクロロブタノール、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、フェニル水銀塩、チメロサル、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン等が挙げられる。等張化剤としては、例えば食塩、ブドウ糖、D-マンニトール、グリセリン等が挙げられる。溶解剤としてN-メチルグルカミン等を用いても良い。またpH調整剤としては、例えば水酸化ナトリウム、塩酸等が挙げられる。

【0011】本発明の薬剤に含有されるべきカルボスチリル誘導体(I)またはその塩の量はとくに限定されず広範囲に選択されるが、通常全組成物中1~70重量%、好ましくは5~50重量%である。眼疾患治療剤と*

2-(4-クロルベンゾイルアミノ)	
-3-(2-キノロン-4-イル) プロピオン酸	0.2 g
塩化ベンザルコニウム	0.01 g
リン酸二水素ナトリウム	0.56 g
リン酸二水素カリウム	0.8 g
蒸留水	適 宜
計	100.0 ml

上記各成分を蒸留水に溶解し、適当なフィルターペーパーを用いて滅菌濾過して点眼剤の形態を有する本発明薬※

※剤を製造した。

【0015】製剤例2

2-(4-クロルベンゾイルアミノ)-3-(2-キノロン-4-イル) プロピオン酸	15.0 g
アビセル(商標名、旭化成(株)製)	4.0 g
コーンスターク	3.0 g
ステアリン酸マグネシウム	2 g
ヒドロキシプロピルメチルセルロース	1.0 g
ポリエチレングリコール-6000	3 g
ヒマシ油	4.0 g
メタノール	4.0 g

本発明化合物、アビセル、コーンスタークおよびステアリン酸マグネシウムを混合研磨後、糖衣R10mmのキネで打錠する。得られた錠剤をヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリエチレングリコール-6000、ヒマ

*してとくに好ましい眼適用製剤の場合は、通常 製剤組成物全量当り約0.005~5重量%、好ましくは0.01~3重量%とするのが良い。また、投与方法には特に制限はなく、各種製剤形態、患者の年令、性別その他の条件、疾患の程度などに応じた方法で投与される。例えば錠剤、丸剤、液剤、懸濁剤、乳剤、顆粒剤、シロップ剤およびカプセル剤の場合には経口投与される。また注射剤の場合には単独あるいはブドウ糖、アミノ酸などの通常の補液と混合して静脈内投与され、さらには必要に応じて単独で筋肉内、皮内、皮下もしくは腹腔内投与される。坐剤の場合には直腸内投与される。また、眼適用製剤は従来の眼適用製剤と同様に、例えば、眼軟膏剤の場合には眼に塗布され、また、点眼剤の場合は従来の点眼剤と同様の方法で投与でき、例えば適当な点滴容器から眼に1~2滴滴下するか、または噴霧装置により眼に噴射すれば良い。

【0012】本発明の薬物の投与量は、投与方法、患者の年齢、性別その他の条件、疾患の程度により適宜選択されるが、通常カルボスチリル誘導体(I)またはその塩の量は1日当り体重1kg当り0.6~5.0mgとするのがよい、また、投与単位形態中に有効成分を10~100.0mg含有せしめるのがよい。また、眼適用製剤、例えば点眼剤または眼軟膏剤は1日当たり1~15回、好ましくは1~10回の範囲で投与される。

【0013】

【実施例】つぎに製剤例および薬理実験を挙げて本発明の眼疾患治療剤をさらに具体的に説明する。

【0014】製剤例1

シ油およびメタノールからなるフィルムコーティング剤	
で被覆を行ないフィルムコーティング錠を製造する。	
【0016】製剤例3	

2-(4-クロルベンゾイルアミノ)-3-(2-キノロン-4-イル)プロピオン酸	15.0g
クエン酸	1.0g
ラクトース	33.5g
リン酸二カルシウム	70.0g
ブルロニックF-68	30.0g
ラウリル硫酸ナトリウム	15.0g
ポリビニルピロリドン	15.0g
ポリエチレングリコール(カルボワックス1500)	4.5g
ポリエチレングリコール(カルボワックス6000)	45.0g
コーンスターチ	30.0g
乾燥ラウリル硫酸ナトリウム	3.0g
乾燥ステアリン酸マグネシウム	3.0g
エタノール	適量

【0017】本発明化合物、クエン酸、ラクトース、リン酸二カルシウム、ブルロニックF-68およびラウリル硫酸ナトリウムを混合する。上記混合物をNo. 60スクリーンでふるい、ポリビニルピロリドン、カルボワックス1500および6000を含むアルコール性溶液で湿式粒状化する。必要に応じてアルコールを添加して粉末をペースト状塊にする。コーンスターチを添加し、均一な粒子が形成されるまで混合を続ける。No. 10スクリーンを通過させ、トレイに入れ100℃のオーブンで12~14時間乾燥する。乾燥粒子をNo. 16スクリ*

*ーンである、乾燥ラウリル硫酸ナトリウムおよび乾燥ステアリン酸マグネシウムを加え混合し、打錠機で所望の形状に圧縮する。上記の芯部をワニスで処理し、タルクを散布し湿気の吸収を防止する。芯部の周囲に下塗り層を被覆する。内服用のために十分な回数のワニス被覆を行う。錠剤を完全に丸くかつ滑かにするためにさらに下塗層および平滑被覆が適用される。所望の色合が得られるまで着色被覆を行う。乾燥後、被覆錠剤を磨いて均一な光沢の錠剤にする。

【0018】製剤例4

2-(4-クロルベンゾイルアミノ)-3-(2-キノロン-4-イル)プロピオン酸	5g
ポリエチレングリコール(分子量: 4000)	0.3g
塩化ナトリウム	0.9g
ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート	0.4g
メタ重亜硫酸ナトリウム	0.1g
メチルーパラベン	0.18g
プロピルーパラベン	0.02g
注射用蒸留水	10.0ml

【0019】上記パラベン類、メタ重亜硫酸ナトリウムおよび塩化ナトリウムを攪拌しながら80℃で上記の約半量の蒸留水に溶解する。得られた溶液を40℃まで冷却し、本発明化合物、つぎにポリエチレングリコールおよびポリオキシエチレンソルビタンモノオレエートをその溶液中に溶解する。次にその溶液に注射用蒸留水を加えて最終の容量に調製し、適当なフィルター-ペーパーを40用いて滅菌濾過することにより滅菌して、注射剤を調製※

※する。

【0020】薬理実験1

(1) 供試液

本発明の活性成分の具体例である2-(4-クロルベンゾイルアミノ)-3-(2-キノロン-4-イル)プロピオン酸(以下、単に本発明化合物という)を用い、下記のようにして溶解液および懸濁液を調製し、これを試験液とした。

a) 3%溶解液

本発明化合物	3.00g
メグルミン(N-メチルグルカミン)	2.64g
濃グリセリン	1.80g
塩酸	適量
10%塩化ベンザルコニウム	0.10ml
水	全量10.0mlに調製
pH	8.3~9.3の範囲で調節

b) 3%懸濁液

本発明化合物	3.00 g
リン酸二水素ナトリウム	0.40 g
リン酸水素ナトリウム	0.47 g
塩化ナトリウム	0.50 g
カルボキシメチルセルロースナトリウム	0.20 g
ポリソルベート 80	0.16 g
10% 塩化ベンザルコニウム	0.10 ml
水	全量 100 ml に調製
pH	6.5 ~ 7.5 の範囲で調節

なお、コントロールとして生理食塩水を用いた。

【0021】(2) 実験方法および結果

正常家兎（各群3羽6眼）の両眼に、上記供試液を1回 $50 \mu l$ /眼の用量で4回/日点眼し、2週間点眼を続けたのち、家兎を屠殺し、下記3項目について測定した。

【0022】(イ) 結膜被覆粘液量の測定

—アルシアンブルー (Alcian Blue) 色素結合法による測定

上記家兎を屠殺後、全結膜を摘出し、この結膜を氷冷した0.25Mショ糖水溶液で洗浄したのち、その組織重量を測定した。上記結膜を0.1%アルシアンブルー10ml中で室温にて1.5時間インキュベートしたのち、0.25Mショ糖水溶液で15分、さらに同液で45分洗浄した。この結膜を、さらに0.5M MgCl₂水溶液10ml中で室温にて2時間インキュベートして結膜の粘液に結合した色素を溶出した。この溶出液をジエチルエーテル10mlで洗浄し、その水層を605nmにて吸光度を測り、組織重量当りの吸光度 (O.D. 単位/g組織) (平均士S.E., n=4) を算出した。その結果を図1に示す。図1から明らかなように、本発明化合物の3%溶解液および3%懸濁液を点眼した家兎では、その結膜粘液に結合した色素量がコントロールに比し大きく、本発明化合物が結膜被覆粘液量を増大したことを示す。

【0023】(ロ) 結膜ゴブレット細胞数の測定

—インプレッションサイトロジーによる測定

前記供試液で処理した家兎の眼球上部鼻側眼球結膜を軽く乾燥させ、それにミリポアフィルターを置き、圧迫して結膜上皮細胞およびゴブレット細胞を採取した。これらの細胞を70%エタノールにより固定したのち、過ヨウ素酸シッフ反応 [Periodic Acid Schiff reaction (PAS)] およびヘマトキシンを用いて染色し、ついでキシレンにてフィルターを透明化し、プレパラートに封入した。これを写真撮影して、一定面積 (0.09m²) 当りのゴブレット細胞数 (平均士S.E., n=4) を算定した。その結果を図2に示す。図2から明らかなように、本発明化合物の3%溶解液および3%懸濁液を点眼した家兎では、コントロールに比し、ゴブレット細胞数が増大しており、本発明の化合物がムチン量の増大、ひいては涙液量の増大をもたらすことが判る。

【0024】(ハ) 涙液量の測定

—シルマーテスト第1法変法による測定

前記供試液で処理した家兎に、下記涙液測定の5分前にベノキシール (参天製薬) 30μlを点眼し、4分間放置後、眼表面の水分を拭きとった。1分後、その下眼瞼にシルマー試験紙を挿み (涙液測定開始) 、5分間放置したのち、シルマー試験紙にしみ込んだ涙液の長さ (mm) (平均士S.E., n=4) を測定した。その結果を図3に示す。図3から明らかなように、本発明化合物の3%溶解液および3%懸濁液を点眼した家兎では、コントロールに比し、涙液量が増大した。

【0025】薬理実験2

(1) 実験方法

ニュージーランドホワイト種雌性家兎眼球を摘出して強角膜片を作製し、実体顕微鏡下でデスマ膜および内皮細胞を剥離したのち強角膜片をリン酸緩衝生理食塩水で4~5回洗浄し無菌にした。ついで、その強角膜片をダルベッコ改変イーグル培地F12 (DME/F12)

(1:1) に入れ、カミソリで全角膜から2~3mm角の角膜ブロックを1個の角膜から約20個切り出した。

30 60mm径の組織培養皿に7~8個/皿の角膜ブロックを角膜上皮が上になるように密着させ、10%FCS、10ng/ml hEGF添加DME/F12 (1:1) 培地中で5%CO₂-95%Air、37°Cにて培養した。培養2日後に、角膜上皮片を除去し、培地を交換した。4~5日間培養を続け (培地交換1~3回) 、培地を除去し、リン酸緩衝液で洗浄後、0.1%トリプシン-0.02%EDTAで細胞を浮遊させ、10%FCS入りのDME/F12 (1:1) 培地に懸濁し、2×10⁴ cells/wellになるよう12穴マルチウェル培養皿に播種した。約12時間後に1%FCSを含むDME/F12 培地に交換し、薬理実験1で用いたのと同じ本発明化合物を最終濃度が10⁻⁴~10⁻⁶ Mになるように加えた。該化合物はDMSOで溶解した。本発明化合物添加約48時間後に、上記の本発明化合物を含む培地の交換を行った。本発明化合物添加約96時間後に0.1%トリプシン-0.02%EDTAで細胞を浮遊させ、コールターカウンターにより細胞数 (平均士S.E., n=6) を測定した。なお、対照として本発明化合物の代わりにヒアルロン酸ナトリウム (1mg/ml) を用いて同様に測定した。

40 50

(2) 結果

その結果を図4に示す。図4から明らかなように、本発明化合物で処理した場合、角膜上皮細胞増殖作用を有することが知られているヒアルロン酸ナトリウムよりもさらに優れた角膜上皮細胞の増殖作用が認められた。なお、図4中、* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$ を意味する。

本発明化合物	0.5 g
N-メチルグルカミン	1.32 g
濃グリセリン	0.45 g
10%塩化ベンザルコニウム	50 μl
生理食塩水	全量 5.0 ml に調製

pH 8.8~9.3 の範囲で調節

【0027】(2) 実験方法

塩酸ケタミン 200 mg / 体重の筋肉注射および塩酸オキシブロカイン 2滴 / 眼の点眼による麻酔下、瞬膜を切除した NZW 種雌性家兎 [1群 5羽、10眼 ($n = 10$)] を用いた。ドライヤーと角膜の距離 10 cm、送風時間 10 分にてドライヤーによる風を角膜のみに正面から当てることにより、該実験動物の涙液を蒸発させて角膜を乾燥し、障害 (ムチン被覆障害、角膜上皮障害) を作製した。この実験動物に対し、上記供試液を、2.5 時間間隔にて 1日 4回点眼し、送風前 2週間から前投与、送風後 2週間までの後投与を行った。

【0028】(3) 評価方法および結果

供試液の点眼開始前、送風開始前、送風開始後 1、4、7、10 および 14 日に下記の生体染色を行って障害を評価した。

①ローズベンガル生体染色による障害のスコア評価

ローズベンガル生体染色 : ムチンで覆われていない細胞を染色した (角膜上のムチン被覆障害を評価)。

スコア評価について (満点: 3点)

スコア 0 : 角膜が全く染色されない。

スコア 1 : 全角膜の 1/3 以下の面積が均一に染色される、もしくは 2/3 以下の面積が点状に染色される。

スコア 2 : 全角膜の 1/3 ~ 2/3 の面積が均一に染色される、もしくは 2/3 以上の面積が点状に染色される、もしくは全角膜の 1/3 以下の面積が均一に染色され点状の染色も認められる。

スコア 3 : 全角膜の 2/3 以上の面積が均一に染色される、もしくは全角膜の 1/3 ~ 2/3 の面積が均一に染色され点状の染色も認められる。

その結果 (平均 ± S.E., $n = 10$ 眼, $p < 0.05$ vs コントロール) を図5に示す。図5から明らかなように、本発明の 1% 点眼液を投与した群では、ムチン被覆障害がコントロール群に比べて有意に抑えられた。

②フルオレセインナトリウム生体染色による障害スコア評価

フルオレセインナトリウム生体染色 : 細胞の欠損部や細胞間隙の異常部を染色した (角膜上皮障害を評価)。

(7) * 【0026】薬理実験3 送風ドライアイモデルでの実験

(1) 供試液

下記处方にしたがって、本発明の化合物の 1% 点眼液を調製した。また、下記处方から本発明化合物を除いたものを対照液 (コントロール) として用いた。

本発明化合物	0.5 g
N-メチルグルカミン	1.32 g
濃グリセリン	0.45 g
10% 塩化ベンザルコニウム	50 μl
生理食塩水	全量 5.0 ml に調製

pH 8.8~9.3 の範囲で調節

浸透圧 290~300 mOsm に調節
スコア評価について : ローズベンガル生体染色の場合と同じ。

その結果、送風後 1 日後にコントロール群ではフルオレセインナトリウム生体染色による障害スコア評価が 2 以上であったのに対し、本発明の 1% 点眼液投与群では約 1 であった。このことから本発明化合物は点眼により送風による角膜上皮障害を有意に抑制した。

【0029】薬理実験4 強制開瞼ドライアイモデルでの実験

(1) 実験方法

ウレタン 2 g / kg (i.p.) 麻酔下に瞬膜を切除した NZW 種雌性家兎 [1群 4羽、8眼 ($n = 8$)] を用い、室温 (約 25°C) にて開瞼器により眼を強制的に 2 時間開瞼させた角膜を乾燥させ障害を作製した。この実験動物に対し、前記薬理実験 3 で用いたと同じ供試液を用い、2.5 時間間隔で 1 日 4 回、開瞼前 2 週間から強制開瞼 5 分前まで点眼させた。

【0030】(2) 評価方法と結果

強制開瞼 2 時間後にメチレンブルーにより下記の操作にしたがって角膜上皮障害部 (細胞の欠損部) を染色し、その色素量を測定することにより定量的に評価した (角膜上皮障害を評価)。

①強制開瞼終了後、1% メチレンブルー溶液 50 μl を点眼し、

②生理食塩水で十分に洗浄し、

③過剰量のペントバルビタール注射液の静注により安楽死させたのち、角膜を摘出し、

④アセトン / 飽和硫酸ナトリウム (7:3) 混合液で摘出した角膜よりメチレンブルーを一晩かけて抽出し、

⑤その抽出液の 660 nm における吸光度を測定した。

その結果を図6に示す (平均 ± S.E., () 内は眼数を示す)。図6から明らかなように本発明の 1% 点眼液を投与した群では有意に色素量が少なく、強制開瞼による角膜上皮障害が抑制されたことがわかる。

【0031】薬理実験5 ムチン除去ドライアイモデルによる実験

(1) 実験方法

50

NZW種雌性家兎〔1群5羽、10眼($n=10$)〕、正常眼では3羽、6眼($n=6$)〕に、N-アセチルシスティン(濃度10%)を1日間だけ2時間間隔で6回点眼することにより、結膜上のムチンを溶解、除去して障害を作製した。上記実験動物に、そのムチン除去処理の翌日から、前記薬理実験3で用いたと同じ供試液を、2.5時間間隔にて1日4回、2週間点眼した。

【0032】(2) 評価方法と結果

点眼開始2週間後に、以下の操作にしたがって、アルシアノンブルー色素結合法により結膜被覆ムチン様物質の量を測定することにより定量的に評価した。

- ①過剰量のペントバルビタール注射液の静注により安樂死させたのち、角膜を摘出し、
- ②氷冷した0.25Mショ糖で洗浄し、
- ③水分を除去したのち、結膜組織重量を測定し、
- ④0.1%アルシアノンブルー溶液10mL中で結膜を室温で1.5時間インキュベートし、
- ⑤0.25Mショ糖10mLで余分な色素を洗浄、除去し、
- ⑥0.5M塩化マグネシウム溶液10mL中で結膜を室温で2時間インキュベートして結膜粘液に結合した色素を溶出し、
- ⑦溶出液をジエチルエーテル溶液10mLで洗浄し、
- ⑧溶出液の水層についてその吸光度を605nmで測定*

*し、アルシアノンブルー色素結合量を、吸光度/g組織重量で表示した。

その結果(平均±S.E.)を図7に示す。図7から明らかなように、本発明の1%点眼液投与群では結膜ムチン様物質の量がコントロール群に比べて有意に増加し、正常眼に近い値を示しており、ムチン欠失障害に対して有効であることがわかる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 アルシアノンブルー色素結合法による正常家兎における結膜被覆粘液量に対する本発明化合物の影響を示すグラフ。

【図2】 正常家兎のゴブレット細胞数に対する本発明化合物の影響を示すグラフ。

【図3】 正常家兎の涙液量に対する本発明化合物の影響を示すグラフ。

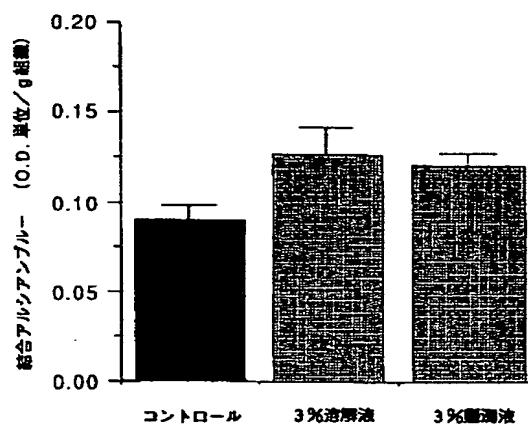
【図4】 家兎角膜上皮細胞の増殖に対する本発明化合物の作用を示すグラフ。

【図5】 送風ドライアイモデル(家兎)における本発明化合物のムチン被覆障害抑制作用を示すグラフ。

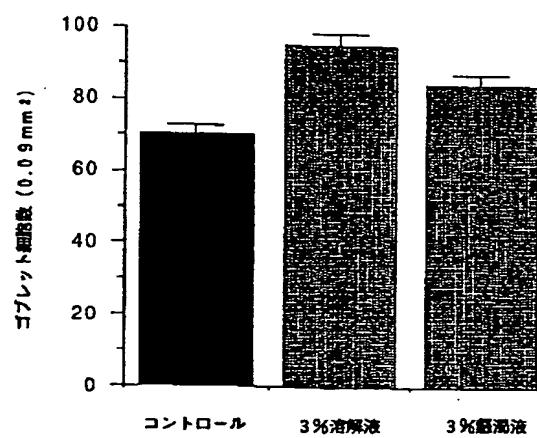
【図6】 強制開瞼ドライアイモデル(家兎)における本発明化合物の角膜上皮障害抑制作用を示すグラフ。

【図7】 ムチン除去ドライアイモデル(家兎)における本発明化合物の結膜ムチン様物質增加作用を示すグラフ。

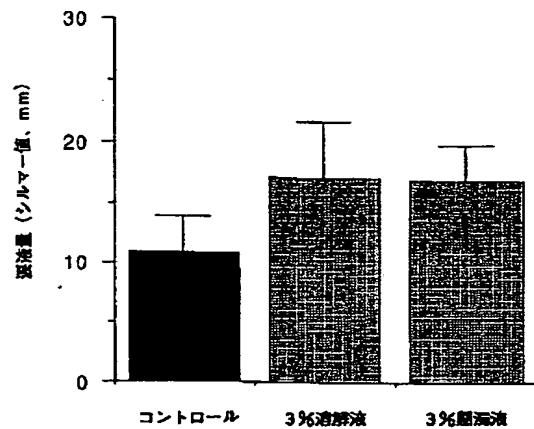
【図1】



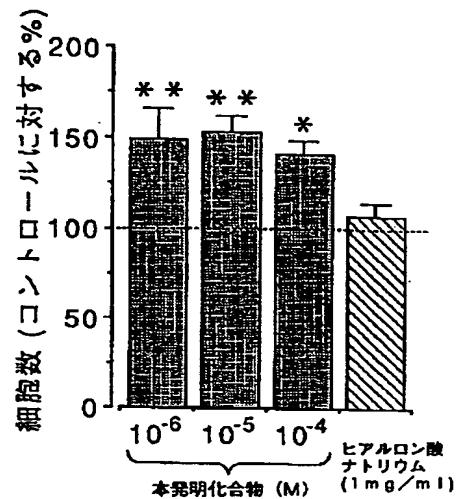
【図2】



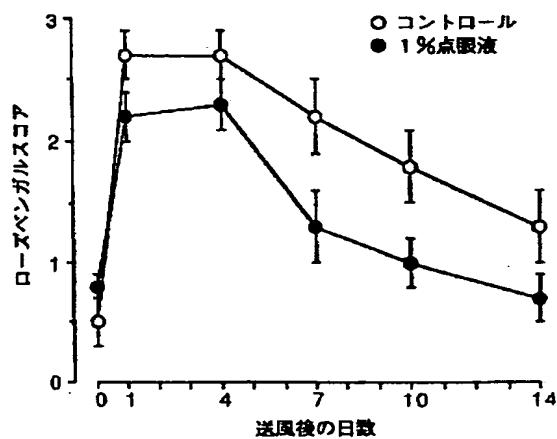
【図3】



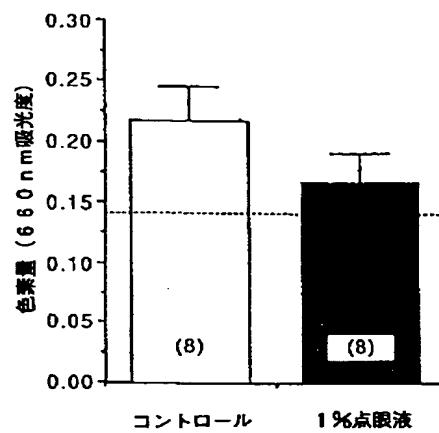
【図4】



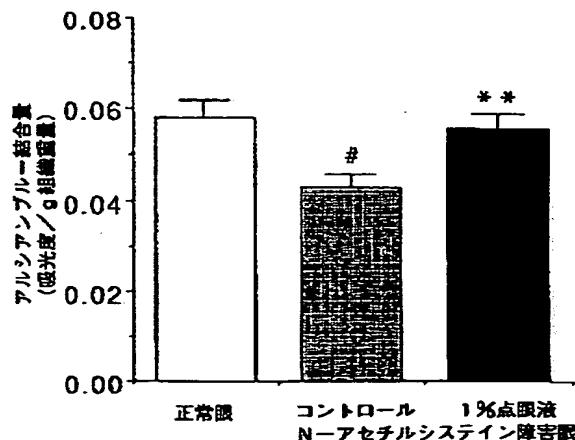
【図5】



【図6】



【図7】



* : $p < 0.005$ vs 正常眼 (*t*-test)

** : $p < 0.01$ vs コントロール (*t*-test)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.